台灣土壤環境生態與根瘤菌

趙震慶
國立中興大學土壤系

摘　　要

根瘤菌與豆科作物的共生作用，於今日推展永續性農耕法中，爲不可缺之土壤管理或輪作程序之一。優良人工培養根瘤菌菌株在土壤生態環境中之命運及共生固氮作用受限之探討，爲成功推展根瘤菌於農業生產上極重要之課題。

人工培養的國外菌株 *Rhizobium loti* 94A_3，在酸性壤土中42天後存活率約下降 1000 倍，而在 140天的銀合歡生長期中，根瘤菌移動距離約爲15公分左右。與土棲性菌競爭根瘤生成之能力弱。然於酸性林地土壤中，仍有助根瘤之生成與銀合歡初期之生長。*R. fredii* 及 *Bradyrhizobium japonicum* 之生長世代時間與於根系競爭根瘤生成率及在乾土中存活率間無相關。重金屬抑制大豆根瘤乙炔還原活性，抑制力之大小因土壤種類而異。 pH 4.2 之紅壤，提升根圈 pH，有助有效性根瘤之形成。土棲性大豆與銀合歡根瘤菌對抗生素之抗藥性約高國外菌株5至30倍，殺菌劑對根瘤菌之毒性較殺蟲劑及殺草劑爲強。

關鍵字:根瘤菌，土壤，生態

前　　言

基於自然界氮素循環及農業生產上之觀點，根瘤菌爲重要而不可缺之土壤微生物，尤其近年倡導的有機農耕法(organic farming)利用根瘤菌與豆科作物形成高固氮能力的根瘤，將大氣中氮氣變爲植物所需之氮素養分，視爲增加或保持土壤氮素肥力最有效方法之一(洪，王，1987)。人工培養優良根瘤菌在土壤環境的生態條件下，其命運及能否形成有效根瘤，爲成功推展根瘤菌於農業生產上極重要之課題。土壤之組成包成氣，液與固體三相，而此三相在一土體中相互雜陳構成異質性(heterogeneity)棲息地，而微棲息地(microenvironment)中多種組成成分因時而異，深具變動性(dynamic nature)，此爲研究土壤微生物生態最主要困難處(Metting，1992)。探討土壤環境生態與根瘤菌的報告極眾，但綜合性回顧根瘤菌與土壤環境生態的報導仍屬少見。早期 Bushby(1982)曾廣泛報導土壤礦物，離子強度，土粒吸附，土壤有機質，植物根圈，土壤 pH 及相關離子(Ca，Al，Mn)，可溶性鹽，濕度，抗旱性，土壤肥力等等因子對根瘤菌存活於土壤中之效應。隨後 Alexander (1984)亦認爲需瞭解這些土壤環境生態因子對根瘤菌之刺激效應與限制因子，而評估根瘤菌在各種條件土壤中之存活率及於相對應豆科植物根系成瘤能力。Bottomley(1992)更廣泛依土壤，宿主及基因工程等方面探導土壤環境生態因子對根瘤菌之正、負效應。本報告僅依近十年以來，作者所撰有關台灣土壤環境因子對根瘤菌之影響，綜合敘述於後，疏漏謬誤之處，尚祈各先進，學者及專家不吝指正。

石灰用量對根瘤菌存活之效應 (趙，楊，1985)

將銀合歡根瘤菌 *Rhizobium loti* Nif 94 A_3 接入自然土壤中，於不同採樣期依螢光抗體染色法(fluorescent antibody method)測數菌數結果如表一。接種後第二天，土壤中的菌數，減少5至8倍，其原因可能係因根瘤菌具有細胞外多糖(extracelluar polyaccharide)含有 D-glucuronic acid，D-galacturonic acid，glucans 等成分，這些成分因氫鍵或二價離子，易被土壤黏粒吸著，同時所用的螢光顯微鏡係穿透式光源，土粒上下兩側吸收的根瘤菌無法顯像。其次部份菌體可能因土粒的吸附作用，在靜置的一小時中，沉降到下層土懸液中，減少上層土懸液的菌數。不接種的兩個對照土壤，染色後亦有菌體呈黃綠色螢光，歸屬正反應，顯示新化土壤中含有與 *R. loti* Nif 94A_3相同血清型(serotype)的銀合歡根瘤菌。

在42天培養期中，各採樣期土壤中呈正反應的細胞數之變化如表一所示，人工培養的根瘤菌，在接種於自然土壤中後，菌數隨時間增加而減少，在42天中，約下降 1000～2000 倍。其次接種處理的螢光染色正反應細胞數，下降的比率，隨時間增加而減緩，在第一週中菌數變化較爲激烈，此可能因菌懸液中，含有死亡菌體，在自然土壤中 1～2 週即會消失，或可能因接種菌數過多，土壤養分供應不足所致。

其次以同一培養基所培養的 *R. loti* Nif 94 A_3，接入 pH 6.60 高石灰(1.0g 石灰/公斤 風乾土，C_1)及 pH 5.4 低石灰(0.1 g石灰/公斤 風乾土，C_2)用量土壤中(表一)，觀察每克乾土中存活呈正反應的細胞數，對 Vincent 氏培養基所培養的 *R. loti* Nif 94 $A_3(R_1)$而言，在 C_1 土壤中第七天的存活率爲第二天的34.16%，而在 C_2 土壤爲10.12%，相差三倍，14天到28天的三次測值，R1 在兩種不同石灰用量土壤中存活率近似無差別。再以 Cassman 等氏培養基培養的*R. loti* Nif 94 $A_3(R_2)$，接入低石灰用量土壤中(C_2)，其第7，14，21，28天對第二天的存活率，依次爲11.17%，4.75%，2.39%及0.5%，比接入高石灰用量土壤中(C_1)的存活率，依次爲6.6%，0.96%,0.26%及0.13%，高2～10倍，顯示 pH 5.35 以半乳醣爲碳源的 Cassman 等氏培養基所培養之 *R. loti* Nif 94 A_3，在 pH 5.4 的土壤中存活率較高。

上述結果顯示，人工培養基中所含的碳源及 pH，可能會影響到 *R. loti* Nif 94A_3 在不同 pH 及石灰用量土壤中的存活率。如培養基所用碳源及 pH 能配合土壤 pH，將可能增加根瘤菌在土壤中的存活率，而增加有效根瘤的生成。因此在製備根瘤菌接種用粉劑時，培養根瘤菌所用的培養基中的碳源與 pH，應與土壤的理化性質，特別是土壤的酸鹼性配合。

R. loti Nif 94A_3 在施石灰土壤中的移動 (趙及楊，1987)

人工培養的根瘤菌在土壤中的移動性，可由鑑定接種菌系在豆科植物根系上的根瘤，而查知其移動的能力。*R. loti* Nif 94A_3 在新化加石灰土壤中移動的情形列於表二。人工培養根瘤菌 *R. loti* Nif 94 A_3，接種到高石灰用量(1 g石灰/Kg 土)土壤中(C_1)，在0-15 cm 以內*R. loti* Nif 94 A_3所佔根瘤數的百分率最高爲 16.30 至 10.90，隨距離增加而減少，在15公分以上，僅有0.5%近似於對照組，可視爲土生性菌感染生成的根瘤。相同的在低石灰用量(0.1g 石灰/Kg土)土壤中(C_2) 之移動，在 0-5 公分，*R. loti* Nif 94A_3 菌株所形成之根瘤佔總瘤數之22.87 %，依次漸

減，當距接種位置15公分以上時，僅有3.58%。由此項結果可以瞭解，在140天植期中銀合歡根瘤菌，在土壤中移動之距離，至少在10公分左右，最遠或可達15公分以上，但大多數均在15公分以內。銀合歡 K8 品系在二種石灰用量土壤中，140天內根系生長可達30公分以上，而生長於兩種不同培養基之根瘤菌 *R. loti* Nif 94A_3，在此兩種石灰處理的土壤中，最遠僅在10-15公分根系內形成根瘤菌，顯示此菌在土壤中移動速率不及根的生長速率，或菌種繼續繁殖移動不佳，因此在田間種植銀合歡後，需要再做二次接種，以利增進銀合歡根圈上有效根瘤菌，而形成高固氮的根瘤。

根瘤菌在土壤中之競爭作用 (趙、楊，1987;Young and Chao，1989)

快生型大豆根瘤菌(*Rhizobium fredii*)與慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)在土壤中競爭生成根瘤之比例如表三，結果顯示各組根瘤菌之間的競爭能力因相互配對而異。快生型根瘤菌(SB 357，SB 651，SB 653)並不能排除慢生型根瘤菌(SB 54，SB 138，SB 212，SB 563及USDA 110)形成根瘤。*R. fredii* 與 *B. japonicum* 相互競爭下，快生型根瘤菌 *R. fredii* 約形成 0-79%的根瘤，依接種所用之菌株而異。同時顯示，在培養基中生長世代時間之長或短，並不能顯示根瘤菌競爭根瘤形成能力之強與弱。

人工培養之 *R. loti* Nif 94 A_3，接種到種植銀合歡的新化施石灰土壤中，於植後140天，以酵素聯繫抗體法(ELISA)鑑定根瘤中抗原，以決定人工培養的外來菌系 *R. loti* Nif 94 A_3，與土壤中原有的土生性菌系間的競爭力。結果列於表二，在高石灰用量土壤中(C_1)，接種 *R. loti* Nif 94 A_3 的處理成瘤率，分別爲 9.68%及 5.79%，在低石灰用量土壤中(C_2)，依次爲 10.04%及9.08%。顯示以人工培養基的 *R. loti* Nif 94 A_3，在低石灰用量土壤中競爭力較佳，但接種處理間無顯著差異。對照處理的成瘤率，在高及低的石灰用量土壤中依次爲0.69%及0.17%，而兩者之間無差異，但與接種處理相比，差異顯著。由上述結果顯示*R. loti* Nif 94 A_3 在新化加石灰的土壤中，對成瘤位置的競爭力不強，可能與此菌是美國引進而對本省土壤環境之不適應性有關。

石灰用量對田間接種根瘤菌之效應 (趙等，1985)

豆科植物接種根瘤菌，以求獲得生物共生固氮之利益，爲研究根瘤菌主要目的之一。本研究田間種植的銀合歡係接種美國 NifTAL 所贈送之根瘤菌粉劑，其效果如表四所示。在植後50天採樣，接種處理的植體乾物重，在相同石灰用量下均大於不接種處理，顯示在本試驗之林地，雖然土壤 pH 僅5.4，交換性鋁爲 30.5～176.0 $\mu g\ g^{-1}$ 土，鋁飽和度爲 7.15～11.97%，而所接種之根瘤菌，對銀合歡之生長仍有所助益，顯示在此種土壤情形下的 pH 及鋁離子濃度對根瘤之成瘤作用並沒有發生抑制作用。在施石灰三處理中，雖接種處理每株乾體重均較不接種處理爲重，然未能達到顯著差異。

有關接種根瘤菌對銀合歡成瘤作用之影響如表四所示，植後50天接種根瘤菌的處理，均能產生根瘤，其瘤數、鮮瘤重及乙炔還原能力等，在石灰每公頃5及10噸情形下最佳(pH 依次爲

7.12及7.14)，與不接種處理相比，達顯著差異。而不施石灰及施石灰15噸的兩處理(pH 爲7.33)，雖瘤數、鮮瘤重及固氮能力均優於不接種處理，但統計上不顯著。由施石灰與否比較，顯示石灰有助鮮瘤重增加。據前人研究，銀合歡只有銀合歡根瘤菌，始能使其形成根瘤。然由前述結果可知試區土壤中仍存有少量土生性銀合歡根瘤菌，由於寄主植物的種植與成長，而漸漸活躍在銀合歡根系，慢慢開始形成有效性根瘤。試驗用地土壤pH爲5.46(部份小區土壤 pH 更低至4.7),但接種劑中的根瘤菌仍然與寄主形成有效根瘤,顯示銀合歡根瘤菌在 pH 5 左右的土壤中仍具有成瘤能力。綜合上述銀合歡能在本省 pH 5.4以上之酸性林地土壤中生長成瘤，施用石灰與接種有效性根瘤菌有助銀合歡之固氮作用及植體生長。

根瘤菌在風乾土中之存活 (趙，趙，1988)

根瘤菌接種到風乾壤土中九天後的存活率如表五，顯示各菌株之間耐旱能力差異很大。其中耐旱力較強之菌株如 *R. meliloti* 102 F34，*R. fredii* SB 136，及*R. loti* LU 66，存活率自1.20至7.91%，而耐旱力較差之菌株如 *B. japonicum* USDA 138等存活率小於0.01%。同時由亞熱帶及熱帶的台灣土壤中所分得之根瘤菌(*R. fredii* SB 99，SB 136及SB 439，*R. loti* Lu 15，Lu 66及Lu 193)在耐旱力上並無明顯高於溫帶土壤所分得菌株(*B. japonicum* USDA 138，*R. phaseoli* 6-3，*R. meliloti* 102 F 34及*R. leguminosarum* 128 C 53)之特徵。

在酵母抽出物甘露醇培養液中，所用菌株除 *B. iaponicum* USDA 138屬慢生型根瘤菌外，其餘九個菌株均屬快生型大豆根瘤菌，其中由台灣土壤所分得之大豆根瘤菌*R. fredii* SB 99，SB 136及SB 439均爲快生型大豆根瘤菌。由本研究結果(表五)看來，世代之間同爲2小時之*R.phaseoli* 6-3之存活率＜0.01%，而 *R. loti* Lu 66且爲1.20%，亦顯示出培養基中的世代時間與在風乾土壤中之存活率無關。

不同土類、重金屬及VA菌根菌對固氮作用之效應 (趙，王，1991)

大豆播種於不同濃度重金屬之三種供試土壤中，接種根瘤菌後，於始花期收穫，測定大豆乙炔還原活性分別列於表六。除少部份處理外，乙炔還原活性隨重金屬之添加及濃度之漸增而遞減。供試之六種重金屬中，鉛對大豆乙炔還原活性抑制力較弱，而鉻、鎘之抑制力較強。依所用本省西部三種主要耕地土類之土壤而言，使用大豆根瘤菌接種劑，在砂頁岩沖積土之大里系與紅壤之平鎮系二種土壤所顯現之固氮作用效果頗佳，然在粘板岩沖積土之二林系土壤所顯現之效果頗差。施用 VA 菌根接種劑之各處理，不論是否添加重金屬，固氮作用之三項特徵，在所用三種試驗土壤中，均優於未施用 VA 菌根菌接種劑之各處理。平鎮系低 pH 之紅壤，沒施用 VA 菌根菌接種劑之各處理，雖均曾同樣接種根瘤菌，但均無根瘤形成。屬於粘板岩沖積土之二林系壤土，乙炔還原活性均低於砂頁岩沖積土之大里系壤土及施用 VA 菌根菌接種劑的紅壤之平鎮系粘質壤土，可能係因二林系土壤有效性磷含量(白雷氏一法磷 24.3 mg/Kg土)較低。屬於紅壤之平鎮系土壤，沒接種 VA 菌根菌接種劑之各處理均沒形成根瘤，係因平鎮系土壤呈強酸性(pH 4.2)，所用之根瘤菌於此種土壤中不能形成根瘤，但所用 VA 菌根菌接種劑係

以大里系微酸性土壤添加鹼性之attapulgite礦物配製，根瘤菌液直接施用到 VA 菌根菌接種劑中，根瘤菌所觸及之微域呈中性，故根瘤形成未受影響而具固氮活性。

根瘤菌之抗藥性 (趙，1987)

(一)對抗生素

自六十個土壤所分得之大豆及銀合歡根瘤菌，在含各不同濃度單一抗生素的酵母抽出物甘露醇洋菜(YEMA)平面培養基上存活分離株數(表七)，因抗生素的種類及菌種的不同而異。大豆根瘤菌，在含青黴素(penicillin)的 YEMA 培養基上的存活率最高，有95.3%的分離株，對青黴素具有抗性，而在含利福平(rifampicin)培養基上的存活率最低，僅46.5%的分離株能存活。銀合歡根瘤菌，亦以在含青黴素培養基上 40.9%的存活率最高，以含康黴素(kanamycin)培養基上 7.3%的存活率最低。無論在那一種含抗生素的培養基上的存活率，大豆根瘤菌均高於銀合歡根瘤菌。其次在含500至4000 μg/ml 各抗生素最高濃度的培養基上，銀合歡根瘤菌在含康黴素、鏈黴素(streptomycin)、四環素(tetracycline)及利福平四種抗生素培養基上均不生長，而大豆根瘤菌仍有5.1至9.3%分離株能生長。於含其餘三種抗生素的培養基上，銀合歡根瘤菌雖均能生長，但比例低於大豆根瘤菌。結果顯示大豆根瘤菌對七種抗生素之抗藥性大於銀合歡根瘤菌。

七種抗生素對兩種根瘤菌生長的抑制力，以康黴素及四環素較強，而青黴素較弱。對抗藥性較強的大豆根瘤菌而言，在1000至4000 μg/ml 高濃度下，抑菌力強的抗生素，如康黴素及四環素，僅5.1%至9.3%的分離株可存活，而抑菌力弱的青黴素，雖濃度高達 2000 μg/ml，仍有64.9%的分離株存活。土棲性銀合歡根瘤菌(表七)亦有相同的趨勢。

依上述結果，自大豆及銀合歡根瘤菌中，依次分選67株及16株抗藥性最強的根瘤菌，以含1000 μg/ml抗生素的液體YEM培養基培養，分別按 Wacek 及 Brill 法接種栽植，於6至8週後測乙炔還原力，顯示經含抗生素液體培養基培養後的83個分離株(每種抗生素測10～15個分離株)，均能形成有效根瘤及固定氮氣，其中21株分離株減少固氮力，25株增加固氮力，37株沒變化。

(二)對農藥

根瘤菌以含有田間推薦使用濃度之六種農藥的培養基培養時，除大生 M45(dithane M45)外，其餘五種農藥對根瘤菌之毒性均低，菌之存活率均在78.4%以上(表八)。其中含納乃得(lannate)及安殺番(thiodan)兩種殺蟲劑的培養基，根瘤菌的存活率高達93.1%以上。僅殺菌劑大生 M45 對根瘤菌之毒性較強，雖有23.6%以上的存活率，但存活菌的生長均不良。結果顯示此六種農藥，尤其是殺蟲劑及殺草劑對此二類根瘤菌均無高毒性。銀合歡根瘤菌對農藥的抗力，均比大豆根瘤菌爲弱，但相差不大，除含三泰芬(beyleton)的培養基兩類菌差達15.4%以外，其餘五種農藥相差3.5%以內，尤其是殺蟲劑幾無差異。結果顯示所用之六種農藥對兩類菌的毒性，並不會因菌種(species)而有明顯的差異。台灣中、南部屬熱帶氣候地區，高溫多雨，農藥使用頻率較溫帶或落後熱帶國家爲高，雖大多數的農藥對根瘤菌的毒性很小，但如大生 M45或益穗(thiram)等殺菌劑的毒性仍然很強，又爲水稻的常用農藥，故土棲性根瘤菌高耐藥性之生成，殺菌劑高頻率施用，或許是原因之一。

（三）水田與林地中根瘤菌抗藥性之差異

試驗所用之銀合歡根瘤菌，分別來自台灣水田及森林土壤，農藥之使用量與頻率，林地遠少於水田土壤。兩種土壤中銀合歡根瘤菌之耐高濃度抗生素菌株的百分率，顯示水田土壤均高於森林土壤(表九)，除四環素的抗藥性菌株百分率，在兩類土壤的比例爲1:1.5外，其餘六種抗生素的百分率相差二倍以上，例如水田土壤分得之分離株，有34株能耐100 μ g/ml以上濃度的紅黴素(erythromycin)，佔水田分離株的20.4％，而森林土壤中的86株分離株都不能生長。此種現象之生成可能係因本省水田所用農藥中包括抗生素，同時飼養家畜禽的飼料中常含有抗生素，因施用廄肥於田間而將殘餘抗生素導入水田，因此土棲性根瘤菌，在土壤生態環境的選擇壓力(selection pressure)下，將會造成高抗藥性變異株。同時根瘤菌的抗藥基因係存在質體(plasmid)上，格氏陰性菌的質體可在不同菌屬(genera)或菌種(species)間自由轉移，此種轉移已證實可在添加養分的土壤中進行。而根瘤菌質體發生變異之頻率(mutation frequency)，對*R. trifolii* 爲 $3.3x10^6$ 到 $7.6x10^7$，而百脈根(*Lotus sp.*)根瘤菌對青黴素的變異頻率爲$1.0x10^{-5}$。筆者曾測得台灣土壤中土棲性銀合歡根瘤菌，每克土壤中含10^5以上的菌細胞，每公頃表土以 $2x10^6$ 公斤估算，每公頃土壤含銀合歡根瘤菌數可達10^{14}以上，則每公頃土壤變異株發生率在10^7至10^9之間，復加長年累月的累積效果，及受人、畜移動之污染，及前述如大生 M45 等殺菌劑的效應，或可造成台灣土棲性根瘤菌對抗生素具有高抗藥性。

結　　論

台灣土壤生態環境與溫帶地區迥異，土棲性根瘤菌所承受之生態環境的選擇壓力(selection pressure)勢必相異。

人工培養銀合歡根瘤菌於酸性土壤中42天後，菌數約下降10^3倍。培養基 pH 能與土壤 pH 相近，有助根瘤菌之存活及有效性根瘤之生成。*Rhizobium loti* Nif 94 A_3在種植銀合歡K_8品系之土壤中，140天的移動距離約爲15公分左右，較根系生長速率爲慢。在酸性土壤中競爭根瘤形成能力弱於土棲性根瘤菌。於 pH 5.4的酸性森林土壤中，接種根瘤菌有助銀合歡樹苗之生長及增進固氮作用。*R. fredii* 及*Bradyrhizobium japonicum* 在土壤中之競爭生成根瘤之能力及風乾土壤中存活率與菌株本身特性相關，與其在 YEM 培養基中生長世代時間無關。大豆根瘤之乙炔還原活性，於所測試三類相異之土壤中，皆隨重金屬施用量增加而減少，減少程度因土壤與重金屬種類而異。強酸性紅壤(pH 4.2)改善根圈pH後，則具共生固氮能力。台灣土棲性根瘤菌對抗生素之抗藥性高於國外菌株5至30倍，殺菌劑之毒性高於殺蟲劑及殺草劑，根瘤菌此種抗藥性可能因台灣農田施用農藥頻度較高所造成。

參考文獻

1. 洪崑煌、王銀波 1987 有機農業。P.229-237. 行政院農業委員會彙編，新興科技在台灣農業運用之可能性及其影響小組評估報告。農委會，台北。

2. 趙震慶、楊秋忠 1985 不同培養基對銀合歡根瘤菌在不同石灰用量土壤中存活的影響。中國農業化學會誌 23:236-241。

3. 趙震慶、楊秋忠、程煒兒 1985 酸土接種根瘤菌及施用石灰對銀合歡生成與成瘤作用之影響。中華農學會報 新 131:35-41。

4. 趙震慶 1987 台灣土生性根瘤菌之抗藥性質。中國農業化學會誌 25:308-317.

5. 趙維良、趙震慶 1988 根瘤菌在乾燥土壤環境中存活的機制。 中華農學會報 新 144:41-52。

6. 趙震慶、楊秋忠 1987 *Rhizobium loti* Nif 94A_3 在不同石灰用量酸土中的移動與競爭對銀合歡成瘤作用之影響。中華農學會報 新 137:21-33。

7. 趙震慶、王銀波 1991 重金屬於台灣主要土類之土壤中對囊叢枝菌根與大豆固氮作用之影響。中國農業化學會誌 29:290-300。

8. Alexander,M. 1984. Ecology of *Rhizobium.* P.39-50, *In* M. Alexander (ed.), Biological nitrogen fixation, Plenum Press, New York.

9. Bottomley, P.J. 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium.* P.293-348, *In* G. Stacey etal. (ed.) Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, New York.

10. Bushby, H.V.A. 1982. Ecology, P.35-75, *In* W.J. Broughton(ed.) Nitrogen fixation Vol. 2 Rhizobium, Clarendon Press, Oxford, Great Britain.

11. Metting, F.B. 1992. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. P.3-26,*In* F.B. Metting(ed.) Soil microbial ecology, Marcel Dekker, Inc.,New York.

12. Young, C.C.,and C.C. Chao. 1989. Intrinsic antibiotic resistance and competition in fast-and slow-growing soybean rhizobia on a hybrid of Asian and US cultivars. Biol. Fertil. Soils 8:66-70.

表一、培養於不同培養基的 *Rhizobium loti* Nif 94 A_3在不同石灰用量非殺菌土壤中的存活細胞數
Table 1. Cell numbers of *Rhizobium loti* Nif 94 A_3 in different media cultured in the nonsterilized liming soil

Treatment	Days after inoculation					
	2	7	14	21	28	42
	Positive cells no. of FA stain $x10^6$g dry soil					
C_1 R_1[1]	1083 c[2]	370 a	66.8a	30.4 a	6.70a	1.05a
C_1 R_2	1891 a	125 c	18.2c	5.0 c	2.50c	0.40a
C_1 CK	0.65e	0.45e	0.3c	0.3 d	0.25d	0.20a
C_2 R_1	780 d	79 d	49.9b	18.7 b	4.85b	0.75a
C_2 R_2	1566 b	175 b	74.4a	37.5 a	8.05a	0.85a
C_2 CK	1.05e	0.95e	0.3c	0.45d	0.20d	0.15a

1. C_1, liming acid soil increase soil pH to 6.60; C_2, liming acid soil increase soil pH to 5.4; R_1, Rhizobium loti Nif 94 A_3 cultured in Vincent`s medium, the cell no. of inoculated in the soil is $6.2\pm.3x10^9$/g dry soil; $R_2$, Rhizobium loti Nif 94 $A_3$ cultured in Cassman`s medium, the cell no. of inculated in the soil is $10\pm0.5x10^9$/g dry soil; CK, non-inoculated.
2. Valued within the same columns followed by a different letter are significantly different (P=0.05 Duncan`s multiple range test).

表二、*Rhizobium loti* Nif 94 A_3在土壤中之移動與競爭
Table 2. Movement and competition of *Rhizobium loti* Nif 94 A_3 in soils

Treatment	% 94 A_3 nodules	% 94 A_3 nodules of distance from inoculation site			
		0-5 cm	5-10 cm	10-15 cm	over 15 cm
C_1[1] R_1	9.68 a[2]	16.30 ± 14.87	11.77 ± 5.20	10.90 ± 2.51	0.50 ± 0.87
C_1 CK	0.69 b	0	0.57 ± 0.98	0	1.43 ± 1.29
C_2 R_1	10.04 a	22.87 ± 11.17	16.13 ± 1.63	6.73 ± 5.83	3.58 ± 4.56
C_2 CK	0.17 b	0	0.57 ± 0.98	0	0

1. and 2. See Table 1. footnote 1. and 2.
3. Mean $\pm$S.D. (three replications)

表三、快、慢生型根瘤菌於土壤中對高雄8號大豆根瘤形成之競爭作用

Table 3. Competition between fast-growing rhizobia, *Rhizobiumu fredii*, and slow-growing rhizobia, *Bradyrhizobium japonicum*, for nodulation of *Glycine max*. cv. Kaohsiung-8 planted in soil

Inoculum strain		Soil	
Resistance to antibiotic	Sensitive to antibiotic	Total nodules	% Nodule occupancy by the resistant strain
R. fredii	*B. japonicum*		
SB 357	SB 138	25	80.1
SB 357	SB 563	18	0
B. japonicum	*R. fredii*		
SB 54	SB 653	22	36.7
SB 212	SB 651	13	100
R. fredii	*R. fredii*		
SB 357	SB 651	15	64.4
SB 357	SB 653	11	0
B. japonicum	*B. japonicum*		
SB 212	SB 54	19	0
SB 212	SB 583	27	65.0
SB 212	USDA 110	34	78.6
SB 562	SB 563	20	0

表四、田間施用石灰及接種根瘤菌之效應

Table 4. The effects of rhizobia inoculation and liming in the field experiment

Lime application tons/ha	Plant dry wt g/plant	Nodule number/plant	Fresh nodule wt. mg/plant	C_2H_2-reduction μM/hr/plant
With inoculation				
0	0.344 bc[1]	5.1 ab	36.8 ab	0.088 abc
5	0.581 ab	8.3 a	60.3 a	0.205 a
10	0.579 ab	7.3 a	48.4 a	0.173 ab
15	0.632 a	3.4 ab	24.3 ab	0.066 bc
Without inoculation				
0	0.260 c	0.0 b	0.0 b	0.0 c
5	0.340 bc	0.2 b	2.4 b	0.023 c
10	0.542 ab	0.4 b	2.2 b	0.009 c
15	0.563 ab	0.0 b	0.0 b	0.0 c

1. Values followed by a different letter are significantly different (P=0.05, Duncan`s multiple range test)

表五、根瘤菌在風乾土壤中的存活率
Table 5. Survival of rhizobia in air drying soil.

Strains	Generation time (hr)	No. at 0 day $x10^6$ CFU/g dry soil	Survival %
Bradyrhizobium japonicum USDA 138	5.4	5.0	<0.01
Rhizobium fredii SB 99	1.1	1.6	0.11
R. fredii SB 136	1.7	6.7	2.93
R. fredii SB 439	1.4	7.8	<0.01
R. loti Lu 15	2.4	18.0	0.34
R. loti Lu 66	2.0	40.0	1.20
R. loti Lu 193	1.0	16.0	<0.01
R. phaseoli 6-3	2.0	17.0	<0.01
R. meliloti 102 F 34	2.2	30.0	7.91
R. leguminosarum 128 C 53	1.1	3.6	<0.01

表六、重金屬與VA菌根對不同土壤之大豆根瘤乙炔還原活性之影響

Table 6. The infuence of heavy metals and VA mycorrhizae on the acetylence reduction activity of soybean nodule in different soils

Treatment of heavy metals		C_2H_4 production					
Kind	Level	Erhlin		Tali		Pinchen	
	mg/kg soil	I*	N	I	N	I	N
		------------------------------n mole/hr. plant------------------------------					
Control	0	79	51	922	208	178	0
	LSD5%	28		434		85	
Cd	5	24	11	743	184	61	0
	25	10	0	305	0	60	0
	125	0	0	0	0	42	0
	LSD5%	21		343		59	
Ni	5	31	26	714	353	186	0
	25	44	15	232	101	57	0
	125	50	0	122	0	33	0
	LSD5%	44		397		68	
Cu	10	19	13	859	687	188	0
	50	10	11	546	336	111	0
	250	0	0	144	0	85	0
	LSD5%	20		352		87	
Zn	20	68	61	814	258	81	0
	100	41	0	331	0	55	0
	500	10	0	116	0	0	0
	LSD5%	47		406		58	
Pb	20	38	52	89	553	210	0
	100	40	38	826	784	66	0
	500	10	10	240	0	35	0
	LSD5%	46		535		60	
Cr	10	35	14	966	357	303	0
	50	21	0	280	205	75	0
	250	-**-		0	0	0	0
	LSD5%	39		574		67	
	LSD5%	49		612		89	

* I: With VAM inoculation; N: Without VAM inoculation.

** The seedings died after germination.

表七、台灣土棲性根瘤菌對不同濃度抗生素之抗性

Table 7. Intrinsic resistance of Taiwan indigenous rhizobia to different concentrations of antibiotics.

Antibiotics		Number of isolates surviving							
		0	50	100	250	500	1000	2000	4000
				---------- μg/ml ----------					
Ampicillin	S[1]	55	n.d.[2]	60	45	25	83	180	n.d.
	L	200	n.d.	21	6	7	8	17	n.d.
Penicillin	S	21	n.d.	31	20	20	66	292	n.d.
	L	153	n.d.	25	16	17	23	25	n.d.
Kanamycin	S	224	68	52	43	21	32	10	n.d.
	L	240	4	2	9	4	0	0	n.d.
Streptomycin	S	169	n.d.	88	n.d.	85	58	27	23
	L	212	n.d.	30	n.d.	5	7	5	0
Tetracycline	S	194	113	82	38	10	13	n.d.	n.d.
	L	173	58	22	6	0	0	n.d.	n.d.
Erythromycin	S	74	30	53	42	107	144	n.d.	n.d.
	L	187	38	10	8	14	2	n.d.	n.d.
Rifampicin	S	241	62	69	17	23	38	n.d.	n.d.
	L	208	18	13	11	9	0	n.d.	n.d.

1. S : Soybean rhizobia, inclnding *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium fredii*. L: Rhizobia belonged to *R. loti* with *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit as host plant.

2. n.d.: not done.

表八、 農藥對根瘤菌存活率之影響

Table 8. Effect of pesticides on the survival of various indignous rhizobia

Pesticides	Concentration[1] ppm		Survival[2] %
Lasso	2150	S3	81.1
		L	78.4
Stomp	1000	S	86.9
		L	83.4
Dithane M45	1750	S	25.1
		L	23.6
Beyleton	83	S	98.9
		L	83.4
Lannate	450	S	99.3
		L	98.1
Thiodan	350	S	93.8
		L	93.1

1. Calculated from racommended concentration.

2. Total no. of soybean and leucaena rhizobia tested were 450 and 259, respectively.

3. See Table 7. footnote 1.

表九、稻田與林地土壤中銀合歡根瘤菌高抗藥性分離株百分數

Table 9. Precent of resistance of leucaena rhizobia isolated from paddy and forest soils to high levels of various antibiotics

Antibiotics	Concentration μg/ml medium	Precent of resistants1	
Ampicillin	500-2000	P[2]	15.6
		F	7.0
Penicillin	500-2000	P	32.3
		F	12.8
Kanamycin	250-500	P	7.8
		F	0
Streptomycin	500-2000	P	8.8
		F	4.7
Tetracyclin	100-250	P	10.8
		F	7.0
Erythromycin	100-1000	P	20.4
		F	0
Rifampicin	250-500	P	11.4
		F	1.2

1. Total no. of isolates from paddy soils and forest soils were 167 and 86, respectively.
2. P: Rhizobia isolated from paddy soils, F: Rhizobia isolated from forest soils

討　　論

台大農化系楊盛行教授問:

1. 根瘤菌之移動, 是平面之移動或深度之移動?

2. 根瘤菌之移動是否會因灌溉水而影響?

中興大學土壤系趙震慶教授答:

1. 係依半球體評估移動距離。

2. 應會因水分向下或平行移動。

Soil Environmental Ecology of Rhizobia in Taiwan

Chen-Ching Chao

Department of Soil Science, National Chung Hsing University

Abstract

One of most important process of crop mangement in rotation system of organic agriculture was the symbiosis of rhizobia with legume. The fate of effective *Rhizobium* strain and the limitation of symbiotic nitrogen fixation in soil environment were very serious topics for successful extension rhizobia to apply in the agricultural production. The effect of soil environment on the rhizobia in Taiwan was summarized as follow:

The cell numbers of *Rhizobium loti* Nif $94A_3$ declined with increasing incubation time in an acid soil and after 42 days the cell numbers declined about 10^3. During 140 days growth period of *Leucaena leucocephala*, the movement of inoculated *R. loti* Nif $94A_3$ in liming soils was only 10-15 cm. The competition of *R. loti* Nif $94A_3$ with indigenous rhizobia was very weak in an acid soil. But, leucaena seed inoculated with *R. loti* Nif 94 A_3, those processe increased the biomass of leucaena and nitrogen fixation of nodule at initial growth stage of leucaena in an acid soil. The generation time of *R. fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* in YEM medium, did not relationship with competition in nodulation of soybean and survival in dry soil. The acetylene reduction activity decreased with increasing the concentrations of Cd, Ni, Cu, Zn, Pb or Cr in three unsterilized soils. The decreased rations depended upon the kinds of heavy metals and soil groups. Increased the rhi-zosphere pH of soybean, this process promoted effective nodulation in a red soil with pH 4.2. The indigenous rhizobia isolated from Taiwan soils generally tolerate higher concentration of antibiotics than strains isolated from other areas of the world. The toxicity of fungicide on rhizobia was more higher than that of pesiticide and herbicide.

Key words：Rhizobium, Soil, Ecology